SUMMARY

The indirect ELISA for quantitative evaluation of antibodies against rotavirus in bovine blood sera using a method of single dilution was developed. The equation of a standard curve obtained by the method of linear regression was used for the prediction of titers using S/P ratio measured in a single dilution of serum. The intervals of permissible values of optical density of control negative and positive sera as well as a positive-negative threshold were determined. The specificity and sensitivity of the method were compared with those of the commercial kit INGEZIM ROTAVIRUS («Ingenasa», Spain). The developed test-system was used for the investigation of sera received from different holdings of the RF.

Литература

1. Выделение ротавируса крупного рогатого скота в культуре клеток / Г.Н. Дороненкова, С.А. Чупин, А.М. Тимина [и др.] // Биотехнология. 2004. №4. С. 47-52.
2. Серийное пассирование ротавируса крупного рогатого скота в гетерологичной культуре клеток / Л.Г. Рамишвили, Г.Г. Рухадзе, Е.А. Непоклонов [и др.] // Вопр. вирусол. 1991. №6. С.521-523.
3. Скибицкий, В.Г. Серологическое обследование крупного рогатого скота на наличие противоротавирусных антител / В.Г. Скибицкий, О.Г. Проценко // Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка с.-х. животных: тез. докл. науч. произв. конф. Минск, 1990. С.10.
4. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 2. Comparison of computation methods for measuring antibody titres in a single serum dilution / D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Mallison [et al.] // Avian Dis. 1982. Vol.27. P. 474-484.

УДК 619:616.98:578.333.3:57.082.26

А.В. Кононов, С.В. Левченко, О.Г. Андреева, О.П. Бьядовская

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСА ДИАРЕИ-БОЛЕЗНИ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Введение

В настоящее время вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС) занимает существенное место в ряду инфекционных заболеваний КРС. Возбудитель ВД-БС КРС является прототипным представителем рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и вызывает у КРС широкий спектр клинических проявлений: аборты, диарею, респираторные заболевания и др. [3].

Изучение иммунобиологических свойств и проведение технологического контроля производства инактивированных вакцин основано на использовании иммунохимических реакций и требует наличия диагностических антигенов и препаратов антител.

Одним из наиболее существенных моментов приготовления диагностикумов и вакцин является получение очищенной концентрированной суспензии вируса.

В литературе имеются сообщения о различных способах очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС. Концентрирование вирусных агентов проводят осаждением с использованием полиэтиленгликоля [1, 2, 6]. Более детальную очистку и концентрирование проводят, используя метод осаждения в изоэлектрической точке, а также применяя обработку детергентами (тритон Х-100) или суспендирующим буфером, содержащим двухвалентные катионы [4, 5].

Целью нашего исследования явился подбор оптимальных методов и условий очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС штамм «NADL».

Материалы и методы

Для очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС нами выбраны следующие методы: осаждение вируса полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующей очисткой сахарозой, осаждение вируса ультрацентрифугированием, применение детергентов в процессе очистки и концентрирования вируса.

Для концентрирования использовали ПЭГ-6000 в виде 50% стерильного раствора, в качестве детергентов применяли Triton X-100 и Tween-20. Очистку вируссодержащей суспензии, для освобождения от чужеродных белков, проводили с использованием 20% сахарозы.

В работе использовали штамм «NADL» вируса ВД-БС КРС, адаптированный к культуре клеток носовых перегородок КРС (ВТ) с титром инфекционной активности 106,75 $ТЦД_{50}$/0,2 $см^3$, который был получен из коллекции АТСС (США).

Данный штамм был адаптирован к отечественной перевиваемой культуре клеток почки сайги (ПС).

Осаждение вируса ВД-БС КРС полиэтиленгликолем и очистка с помощью сахарозы. Исходную вируссодержащую суспензию осветляли низкоскоростным центрифугированием при 700 g в течение 10 минут. Надосадок отбирали (элюат 1), а осадок ресуспендировали в буфере STE до конечного объема суспензии, равного 1% объема исходного вируссодержащего материала [1]. Для высвобождения оставшегося вируса из клеток проводили двухкратное замораживание-оттаивание осадка, после чего его центрифугировали при 700 g. Надосадок (элюат 2) смешивали с элюатом 1, а осадок (клеточный детрит) ресуспендировали в буфере STE. Данную процедуру проводили дважды. Далее работали с объединенными надосадками (элюат 1, 2, 3). Осадок проверяли на остаточную инфекционность в культуре клеток (к/к) и антигенную активность в ИФА.

В объединенный надосадок добавляли ПЭГ-6000 до конечной концентрации 6%, суспензию инкубировали при 4°С в течение 2 ч. После осаждения вируса ПЭГ вируссодержащую суспензию повторно центрифугировали при 6000 g в течение 30 мин, надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 1/100 исходного объема STE-буфере. Под полученную суспензию подслаивали 20% сахарозу и центрифугировали при 10000 g в течение 2 ч. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в STE-буфере.

Осаждение вируса ВД-БС КРС ультрацентрифугированием. Исходную вируссодержащую суспензию осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 2 ч. Осадок ресуспендировали в 1/100 исходного объема в STE-буфере.

Определенной степени очистки достигали, наслаивая содержащую вирус жидкость на небольшой объем буферного раствора, содержащего 20% сахарозы и центрифугировали при 10000 g в течение 1,5 ч. Осадок вируса суспендировали в STE-буфере; для этого раствор приливали к осадку и оставляли на 12 ч при 4° С.

Применение детергентов в процессе очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС. Получение высокоочищенного вируса ВД-БС КРС осложнено тем, что значительная часть вирионов связана с клеточными структурами и при гомогенизации в растворах без детергентов не отделяется от клеток. Для поиска оптимального способа очистки нами были использованы детергенты Triton X-100 и Tween-20.

К двум образцам вируссодержащей суспензии добавляли Triton X-100 или Tween-20 до 0,2% концентрации, суспензии центрифугировали при 1500 g в течение 5 минут. Собирали надосадочные жидкости, а соответствующие образцы осадков клеток гомогенизировали в фосфатно-буферном физиологическом растворе (ЗФР) с pH 7,4 с 0,2%-м содержанием Triton X-100 или Tween-20. Суспензии клеток центрифугировали в том же режиме и соединяли с соответствующими осветленными пробами, полученными после первого центрифугирования.

Осветленные вируссодержащие суспензии очищали от низкомолекулярных белков центрифугированием при 10000 g через 20% сахарозу, приготовленную на ЗФР с добавлением по 0,2% Triton X-100 или Tween-20.

Присутствие культурального ВД-БС КРС подтверждали в ИФА и ПЦР. Инфекционную активность полученных препаратов определяли путем их титрования на к/к ПС, а антигенную активность – в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа коммерческого набора Chekit-BVD-Ag фирмы «IDEXX-Bommeli», и набором для иммуноферментной диагностики вирусной диареи-болезни слизистых КРС (ВИЭВ г. Москва).

Антигенную активность исходного препарата, а также очищенного и концентрированного с помощью ПЭГ с сахарозой, изучали на кроликах. Стерильный адъювант Montanide ISA -70 смешивали с равным объемом (1:1) очищенного и инактивированного антигена ВД-БС и гомогенизировали до получения стабильной эмульсии типа «вода-масло». Животным вводили подогретую на водяной бане до 30-37° С эмульсию. Кроликов иммунизировали в дозе 2 мл трехкратно по схеме:

1. в мякиши подушечек задних лапок;
2. через 7-10 дней в подколенные лимфоузлы;
3. через 21 день после первой иммунизации – внутримышечно.

Через 10-15 дней после 3-й иммунизации доноров обескровливали и получали сыворотку для исследования на наличие антител. Титр антител определяли методом ИФА.

Результаты и обсуждение

Результаты различных способов очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС представлены в табл..

Таблица

Сравнительная оценка способов очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС

Вирусный материал	Активность антигена в ИФА (Chekit)	Титр инфекционности на к/кл ПС (lg ТЦД$_{50}$/см^3)	ПЦР
Исходный материал	1:100	6.75	+
Клеточный детрит	1:100	5.75	+
Объединенные надосадки (элюаты)	1:80	4.75	+
ПЭГ-6000+сахароза (х100)	1:1000	9.50	+
УЦ через сахарозу	1:40	4.50	+
Triton X-100 +сахароза	1:200	6.55	+
Tween-20+сахароза	1:100	5.0	+

В результате проведенных исследований установлено, что наибольший титр вируса на к/к ПС и в ИФА был отмечен в концентрате ПЭГ-6000 с сахарозой (9,50 lg и 1:1000, соответственно). Это совпадает с результатами изучения антигенной активности вирусного материала на кроликах.

При введении животным исходного материала титр вируснейтрализующих антител к вирусу ВД-БС КРС составил 6,5±0,23 log_2 после последней иммунизации. Уровень антител к данному вирусу при введении животным концентрата с ПЭГ-6000+сахароза был сравнительно высоким и составил после последней иммунизации антигена в среднем 9,4±0,46 log_2 (ВИЭВ).

Нужно отметить, что, несмотря на трехкратное эллюирование вируссодержащей суспензии, значительное количество вируса остается в клеточном детрите (5,75 lg и 1:100). Предположительно, это связано с тем, что вирусные частицы очень прочно соединены с клеточными структурами. Это свидетельствует о необходимости изыскания более совершенных методов отделения вируса ВД-БС от клеток.

Как видно из таблицы, осаждение вируса ультрацентрифугированием через сахарозу привело к значительной потере вирусного материала. Титры инфекционности и антигенной активности вируса после очистки этим способом уменьшились (с 6,75 lg до 4,50 lg ТЦД50 и с 1:100 до 1:40, соответственно).

При экстрагировании и 100-кратном концентрировании ВД-БС с использованием в качестве детергента Tween-20 титр инфекционности вирусного препарата уменьшался (с 6,75 lg до 5,0 lg), а титр антигенной активности оставался на прежнем уровне (1:100).

Лучшие результаты были получены при экстрагировании и 100-кратном концентрировании вируса ВД-БС с использованием в качестве детергента Triton X-100. Титр инфекционности вируса на к/к остался на прежнем уровне, а титр антигенной активности в ИФА возрос с 1:100 до 1:200.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали, что концентрирование вируса ВД-БС КРС с использованием ПЭГ-6000, с последующей очисткой через сахарозу, позволяет получать концентрат с высокой инфекционной и антигенной активностью.

Данный концентрат может быть использован для получения высокоактивных гипериммунных сывороток, пригодных для проведения диагностических исследований при ВД-БС КРС.

Однако в силу того, что вирусные частицы достаточно прочно ассоциированы с мембраной клеточной стенки, необходимо усовершенствование методов отделения вируса ВД-БС КРС от клеток для получения высокоспецифичного материала.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе представлены материалы экспериментов по очистке и концентрированию вируса вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота штамм «NADL».

SUMMARY

Experimental data on purification and concentration of NADL strain of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus are presented in the paper.

Литература

1. Вирусология. Методы: пер. с анг. / под.ред. Б.Мейхи. М.: Мир, 1988. 344с.
2. Разработка тест-системы иммуноферментного анализа вируса диареи крупного рогатого скота / Г.А. Халенев, Н.Г. Кирюхина, А.Е. Зеленов [и др.] // БИО. 2003. №1. С. 2-3.
3. Amaral de Zemos, R.A. Diarreia viral bovina / R.A. Amaral de Zemos // Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul. Reconhecimento e Diagnostico. Brasil., 1998. P. 226-258.
4. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral di-

arrhoea virus (BVDV) in field samples / U.I. Laamanen, E.P. Neuvonen, E.M. Yliviuhkola, P.M.-L. Veijalainen // Res. Vet. Sci. 1997. V. 63, N3. P. 199-203.
5. Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections / M.J. Harding, X. Cao, H. Shams [et al.] // Am. J. Vet. Res. 2002. Vol.63, №10. P. 1455-1463.
6. Togaviridae / J.S. Porterfield, J. Casals, M.P. Chumakov [et al.] // Intervirology 1978. Vol.9. P. 129-148.

УДК 619:578.825.1:573.6.086.83:57.083.3.001.8
Е.А. Яснева, А.В. Константинов

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ НА ШТАММЫ «ВК» И «К» ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

Введение

Болезнь Ауески (БА), вызываемая вирусом семейства Herpesviridae рода Varicellavirus, продолжает оставаться одной из самых серьезных проблем для свиноводства многих стран мира [2].

Широкомасштабная вакцинация свиней против болезни Ауески, которая используется для профилактики заболевания, несмотря на значительный клинический эффект, не может препятствовать инфицированию животных, т.к. особенностью возбудителя болезни Ауески является способность вызывать латентную инфекцию, при которой вирус может пожизненно персистировать в клетках ЦНС, миндалин и лимфоузлов. Вирусный геном интегрируется в геноме клетки хозяина и при определенных обстоятельствах способен реактивироваться и инициировать новый цикл размножения вируса, провоцируя возникновение заболевания, выделение вируса во внешнюю среду, инфицируя при этом чувствительных животных [8].

В большинстве развитых стран мира программы искоренения БА основаны на применении «маркированных вакцин» и соответствующих диагностических тест-систем, способных дифференцировать инфицированных животных среди вакцинированного поголовья с последующей их выбраковкой. В настоящее время в качестве таких дискриминирующих тестов используется система на основе блокирующего иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител, как правило, зарубежного производства («Laboratories HIPRA», Испания, «Chekit –ИФА», фирма Bommeli-IDEXX) [1, 4].

Метод иммуноферментного анализа находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой – углубляются и совершенствуются методы самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов (6). Иммуноферментный метод обладает рядом преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями, главными из которых является высокая чувствительность, специфичность, возможность получения количественных данных, автоматизации всех этапов постановки анализа и воспроизводимость. Как и всякий аналитический метод, ИФА кроме достоинств имеет и свои недостатки, прежде всего связанные с фоновыми реакциями, которые становятся все более значимыми по мере того, как растет чувствительность детекторных систем.

Целью нашей работы была оптимизация условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа за счет усовершенствования метода получения антигена вируса болезни Ауески, который может быть использован в ИФА в качестве штамм – специфического при выявлении антител к gE антигену в сыворотке крови, без использования моноклональных антител, а также снижения неспецифической сорбции конъюгата на иммунный и неспецифический комплекс антиген-антитело, который ярко выражен у сывороток кро-